

Office de la propriété intellectuelle du Canada

An Agency of Industry Canada Un organisme

Canadian 🔪 🎤

Office

Intellectual Property

EUI/UA 2004/001968

DECEMBER 2004 20-12.04

d'Industrie Canada

des brevets Certification

La présente atteste que les documents ci-joints, dont la liste figure ci-dessous, sont des copies authentiques des documents déposés au Bureau des brevets.

Certification

This is to certify that the documents attached hereto and identified below are true copies of the documents on file in the Patent Office.

Mémoire descriptif et dessins, de la demande de brevet no: 2,448,843, tel que déposé le 13 novembre 2003, par BIO-K PLUS INTERNATIONAL INC., ayant pour titre: "Effets de Différents Surnageants de Bactéries Lactiques de Bio-K Plus sur des Lignées Cellulaires Endothéliales".

Agent certificateur/Certifying Officer

<u>20 décembre 2004</u>

Date

Canada



Effets de différents surnageants de bactéries lactiques de *Bio-K Plus* sur des lignées cellulaires endothéliales.

Introduction

La recherche sur le cancer vise à découvrir les moyens par lesquels la croissance agressive des tumeurs solides et de leurs métastases peut être abolie de façon spécifique sans engendrer de résistance au traitement, ni provoquer de toxicité excessive chez les patients traités. Ce défi est de taille puisque la transformation des cellules normales en cellules tumorales est associée à l'acquisition d'une importante résistance à la plupart des agents cytotoxiques actuellement utilisés en thérapie. Plusieurs études réalisées au cours des dernières années ont démontré que les cellules tumorales ne représentent pas le seul déterminant responsable de la croissance des tumeurs. Les vaisseaux sanguins présents au sein de ces tumeurs y jouent également un rôle crucial. Il a été clairement établi que ces vaisseaux sanguins, formés par le processus d'angiogenèse, sont essentiels à la croissance agressive des tumeurs et de leurs métastases. Cette angiogenèse est due à la capacité des cellules tumorales à sécréter un certain nombre de facteurs angiogéniques, tels les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et fibroblastique (FGF), liant avec une haute affinité la surface des cellules endothéliales. La stimulation de ces cellules endothéliales par ces facteurs résulte non seulement en une hausse de la sécrétion d'enzymes dégradant les composantes de la matrice extracellulaire, mais également en une stimulation de la migration et de la prolifération de ces cellules. Les cellules ainsi stimulées envahissent la matrice entourant les turneurs, formant un réseau de capillaires qui assure la croissance des cellules tumorales en leur fournissant les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur développement. L'inhibition de l'apport sanguin aux tumeurs constitue donc une cible de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses ciblant spécifiquement l'angiogenèse pour restreindre ou éliminer la progression tumorale.

On estime que les habitudes de vie et l'alimentation sont responsables de plus du tiers des nouveaux cas de cancers diagnostiqués. Par conséquent, la prévention (nutra-prévention) suscite présentement un immense intérêt et il est estimé qu'au cours des prochaines années, elle entraînera des réductions des taux de mortalité reliés au cancer plus grandes que celles atteintes par les traitements actuellement disponibles. Il est donc d'actualité et fort intéressant de caractériser le potentiel antiangiogénique des bactéries lactiques des produits alimentaires Bio-K Plus.

Objectif de cette étude

Notre intention est de déterminer et de caractériser les propriétés antiangiogéniques des produits àlimentaires *Bio-K Plus* (avec et sans produit laitier).

Hypothèse proposée

Les bactéries lactiques composant les produits alimentaires Bio-K Plus sécrètent des molécules actives qui ont une activité antiangiogénique.

Approches expérimentales utilisées

- 1- Effet sur la formation des réseaux de capillaires sanguins:
- 2- Effet sur la migration des cellules endothéliales à travers le vaisseau sanguin vers la tumeur;
- 3- Effet sur la prolifération des cellules endothéliales vers la tumeur.

Conclusion générale suite aux résultats obtenus

À la lueur de l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie de l'étude, les bactéries lactiques contenues dans les produits *Bio-K Plus* semblent sécréter des molécules actives qui ont un potentiel d'activité antiangiogénique. Ainsi, ces molécules actives ont la capacité d'inhiber la croissance de nouveaux capillaires qui soutient la progression de diverses maladies tels les rétinopathies, les hémangiomes infantiles, l'arthrite rhumatorde, le psoriasis, les ulcères duodénaux, la resténose post-angioplastie et la croissance tumorale.

Étude: caractérisation des propriétés antiangiogéniques des bactéries lactiques composant le produit alimentaire de Bio-K Plus sur les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs) et les cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAECs).

1.0 Préparation du matériel d'étude

Dans la présente étude, nous avons caractérisé l'action de divers surnageants provenant des bactéries lactiques (milieu sécrété par les bactéries) et des produits alimentaires Bio-K Plus.

1.1 Surnageants de bactéries lactiques

Les bactéries ont été reçues dans 9 ml de milieu complexe MRS et 100 µl de cette suspension a été multipliée dans 100 ml du même milieu. Après 18 heures d'incubation à 37°C (agitation à une vitesse de 250 RPM), des aliquots de 1,2 ml ont été prélevés et répartis dans des tubes eppendorfs stériles auxquels nous avons rajouté préalablement 0,4 ml de glycérol à 80%. Ces tubes ont été congelés à -80°C.

Afin d'obtenir les surnageants de bactéries lactiques, un volume de 100 μl de suspension bactérienne provenant d'un tube congelé à été prélevé et cette suspension a été multipliée dans 100 ml de milieu MRS (selon la même procédure que décrite précédemment). Après 18 heures d'incubation, un repiquage a été effectué: 1 ml de suspension bactérienne dans 100 ml de milieu MRS (dilution de 1/100). Ce milieu a été incubé à 37°C jusqu'à l'atteinte de sa phase de croissance « log » correspondant à une densité mesurée à 0,5 à A₆₀₀. Par la suite, le surnageant a été obtenu par centrifugation (1 000 x g, 15 min) et filtré deux fois (un filtre de 0,45μm suivi d'un filtre de 0,22 μm). Une partie de ce surnageant a été aliquoté dans des tubes eppendorfs stériles et congelé à -80°C. L'autre partie du surnageant a été concentré 10X à l'aide de tubes Ultrafree-4 (> 5 000 kDa) par centrifugation (3 000 x g, 30 min). Ainsi, nous avons obtenu deux types de

sumageants: un sumageant concentré 10X contenant des molécules dont la taille est plus grande que 5 000 kDa et un filtrat contenant des molécules dont la taille moléculaire est plus petite ou égale à 5 000 kDa. Par la suite, ces sumageants ont été aliquotés et congelés à -80°C.

1.2 Surnageants de produits alimentaires Bio-K Plus

Dans la présente étude, des surnageants ont été obtenus de deux types de produits alimentaires *Bio-K Plus*: un composé avec produit laitier (les protéines du lait sont fermentées) et l'autre sans produit laitier (les protéines du soya sont fermentées). Ces surnageants de ces produits ont été obtenus suite à deux centrifugations (une à 6 000 x g, 15 min, 4°C et une autre à 20 000 RPM, 30 min, 4°C). Par la suite, ils ont été filtrés sur deux filtres (un filtre de 0,45 µm suivi d'un filtre de 0,22 µm) dans le but d'obtenir des surnageants sans bactéries et stériles afin de pouvoir traiter les lignées cellulaires endothéliales. Les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.0 Résultats

2.1 Caractérisation in vitro des surnageants de bactéries lactiques et des produits alimentaires Bio-K Plus sur la formation de structures capillaires par les HUVECs

Dans un premier temps, nous avons vérifié si les surnageants de bactéries lactiques perturbaient la formation de structures capillaires sur Matrigel par les HUVECs. Les cellules ont été ensemencées sur une matrice contenant un mélange hétérogène de facteurs de croissance (bFGF, TGF-β, VEGF, HGF) ainsi que de plusieurs protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibrine) et de protéases (MMPs, uPA, tPA), recréant artificiellement le support matriciel retrouvé in vivo. Une incubation de 6 heures en présence des différents surnageants (dilution 1/4) à 37°C a permis d'observer un effet inhibiteur (variant de 18,2% à 27,5% inhibition; n=2) des surnageants de bactéries lactiques concentrés 10X (Figures 1A, 1B).

De plus, on observe que les réseaux formés sont incomplets et non structurés comparativement au contrôle.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si les surnageants de *Bio-K Plus* perturbaient également la formation des structures par les HUVECs (Figures 2A, 2B). Les résultats semblent démontré que leurs effets ne sont pas significatifs. De plus, mentionnons que le pH des surnageants de *Bio-K Plus* ne semble pas affecter la formation des réseaux.

2.2 Caractérisation in vitro des surnageants de bactéries lactiques et des produits alimentaires Bio-K Plus sur le potentiel migratoire des BAECs et des HUVECs

La migration des cellules endothéliales a été mesurée à l'aide des chambres de culture de type Boyden. Il s'agit de deux chambres contenant des puits de 6,5 mm séparées par une membrane de polycarbonate ayant des pores de 8,0 µm et préalablement induite de gélatine. Cette membrane constitue la barrière artificielle. Les cellules endothéliales en croissance ont été récoltées avec de la trypsine, comptées, centrifugées et resuspendues à une densité de 1,0 X 106 cellules/ml dans un tampon de migration approprié. Les cellules ont été ajoutées aux puits de la partie supérieure de la membrane et incubées à 37°C. Après 30 min d'adhésion, les différents surnageants ont été ajoutés dans les puits supérieur et inférieur de la chambre. Après 2 heures, le VEGF a été ajouté comme chemoattractant dans les puits inférieurs. Après 3 heures, les cellules présentes à la surface interne de la membrane, donc celles qui ont envahi la barrière, seront fixées, colorées et comptées à l'aide d'un microscope à haute résolution. L'activité inhibitrice de chacun des surnageants a été analysée en fonction de la présence ou non du VEGF.

Dans un premier temps, une dilution de 1/4 de chacun des surnageants à tester dans le milieu de culture cellulaire approprié a été utilisée afin de déterminer lequel des surnageants a un effet potentiel sur la migration. Les résultats chez les cellules BAECs démontrent que tous les surnageants ont un effet inhibiteur sur la stimulation de la migration induite par le VEGF (Figures 3A, 3B). De plus, on remarque que pour le surnageant de bactéries lactiques concentré, son inhibition est complète. En ce qui concerne les HUVECs, tous les surnageants inhibent la

stimulation induite par le VEGF, ainsi que le niveau de migration basal (Figures 4A, 4B). L'effet inhibiteur semble plus important pour les surnageants de Bio-K Plus (Figure 4B).

Par la suite, nous avons analysé plus en détail l'effet inhibiteur des surnageants en fonction de la dilution. Les résultats obtenus pour les surnageants de *Bio-K Plus* (avec produit laitier) semblent démontrer que l'effet inhibiteur sur la stimulation induite par le VEGF est fonction de la dilution et que la dilution la plus faible (1/7) a un effet inhibiteur également sur le niveau basal de migration (Figure 5A). Des résultats similaires ont été obtenus pour les surnageants de *Bio-K Plus* (sans produit laitier) (Figure 5B). On remarque cependant que la migration des cellules BAECs semblent plus sensibles aux dilutions 1/20 et 1/10, surtout au niveau basal.

2.3 Caractérisation in vitro des surnageants des produits alimentaires Bio-K Plus sur la prolifération des HUVECs

Le test utilisé pour l'étude de la prolifération cellulaire est le WST-1, une technique qui mesure l'activité mitochondriale des cellules. Pour ce faire, les HUVECs ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 4 000 cellules/puit. Après 24 heures d'incubation, les différents surnageants ont été ajoutés séparément dans chacun des puits. Après 30 min d'incubation, du bFGF a été ajouté. Une solution de WST-1 d'un kit de Boehringer a été ajoutée dans chacun des puits après différents temps d'incubation (0 h, 24 h, 48 h et 72 h) et l'activité métabolique a été quantifiée à 450 nm. L'activité inhibitrice de chacun des surnageants a été analysée en fonction de la présence ou non du bFGF.

Les différents surnageants de *Bio-K Plus* ne semblent pas inhiber la prolifération des HUVECs comparativement au temps 0 (Figures 6A, 6B). De plus, si on compare l'effet de différentes dilutions de surnageant de *Bio-K Plus* (avec produit laitier) et *Bio-K Plus* (sans produit laitier), en absence (Figures 6A, 6B) et en présence de bFGF (Figures 7A, 7B), on constate que la prolifération des cellules est augmentée en présence du facteur de croissance, mais que cette

stimulation semble diminuer et atteindre les niveaux du temps 0, aux dilutions 1/10 et 1/7 (Figure 7B) vers 48 et 72 heures pour les surnageants de *Bio-K Plus* (sans produit laitier).

3.0 Conclusions

L'ensemble des résultats obtenus semble démontrer que les bactéries lactiques du *Bio-K*Plus relarguent dans le surnageant des molécules actives qui ont une activité antiangiogénique.

Les principales conclusions des résultats obtenus sont les suivantes :

- 1-) La fermentation des protéines du lait ne semble pas être responsable de l'action inhibitrice du *Bio-K Plus* puisque lors de la migration, le produit contenant des protéines de soya fermentées inhibe également la stimulation induite par le VEGF;
- 2-) Les molécules actives semblent être d'un poids moléculaire plus grand que 5 000 kDa;
- 3-) Pour observer un effet antiangiogénique sur la formation de structures capillaires par les cellules endothéliales, il faut que le surnageant de bactéries en culture soit concentré 10 fois, ceci pourrait expliquer pourquoi on ne retrouve pas cet effet avec les surnageants des produits alimentaires *Bio-K Plus*.

4.0 Prospectives

Les résultats obtenus supportent clairement la présence d'une activité antiangiogénique par les bactéries constituant le *Bio-K Plus*. Il nous apparaît donc très important de poursuivre la caractérisation de ces propriétés afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le produit

. ,

pourrait agir comme agent anticancéreux. Dans cette optique, nous prévoyons réaliser les expériences suivantes :

- 1-) Déterminer le nombre de bactéries lactiques présentes dans la suspension bactérienne avant centrifugation et le comparer au nombre de bactéries retrouvées dans le produit alimentaire; ceci nous permettra d'évaluer, à dilution égale, la concentration équivalente de bactéries retrouvée dans les surnageants;
- 2-) Poursuivre les études de prolifération et de migration avec les surnageants de bactéries lactiques en fonction de leur dilution;
- 3-) Avec les surnageants qui démontrent une activité antiangiogénique, étudier leurs effets sur d'autres événements cellulaires rattachés à l'angiogenèse comme: a) l'état de phosphorylation de certains récepteurs spécifiques aux cellules endothéliales suite à la stimulation aux facteurs de croissance; b) les niveaux d'expression des métalloproétases, famille d'enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, sécrétées par les cellules endothéliales et c) l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales suite aux traitements.

1. 1

Effets des bactéries lactiques de *Bio-K Plus* sur des lignées cellulaires endothéliales et cancéreuses

Objectif: caractériser les mécanismes moléculaires du *Bio-K Plus* dans diverses lignées endothéliales et cancéreuses humaines.

1.1 Approches expérimentales :

- B. Caractérisation in vitro des propriétés antiangiogéniques du Bio-K Plus sur les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs).
 - 1- Effet sur la prolifération cellulaire;
 - 2- Effet sur le potentiel migratoire des cellules;
 - 3- Effet sur la formation de structures de capillaires sur Matrigel.
- C. Caractérisation in vitro des propriétés anticancéreuses du Bio-K Plus sur la prolifération de 6 lignées de cellules tumorales.
 - 1- MCF-7 (adénocarcinome du sein);
 - 2- Panc-1 (carcinome épithéloïde du pancréas);
 - 3- PC-3 (carcinome de la prostate);
 - 4- Daoy (médulloblastome du cerveau);
 - 5- U-87 (glioblastome-astrocytome du cerveau);
 - 6- Jurkat (lymphocytes de la leucémie).

Ces études permettront de mieux caractériser et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires dans les cellules endothéliales et cancéreuses modulées par le Bio-K Plus.

1.2 Préparation du matériel d'étude

Dans la présente étude, nous avons caractérisé l'action des surnageants de bactéries lactiques irradiées à 3 kGy (S3), 6 kGy (S6) et 9 kGy (S9). Ces surnageants ont été obtenus suite à deux centrifugations (une à 6 000g, 15 min, 4°C et une autre à 10 000g, 20 min, 4°C). Par la suite, ils ont été filtrés sur deux filtres (un filtre de 0,45µm suivi d'un filtre de 0,22 µm) dans le but d'obtenir des surnageants sans bactéries et stériles afin de pouvoir traiter les diverses lignées cellulaires. Les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Pour nos études, nous avons utilisé une concentration de surnageants équivalente à 10⁸ bactéries, puisque selon le mémoire de maîtrise de Cindy Baldwin, c'est à cette concentration que l'effet inhibiteur est maximal.

1.3 Résultats

1.3.2 Caractérisation in vitro des propriétés antiangiogéniques du Bio-K Plus sur les cellules endothéliales de velne ombilicale humaine (HUVECs).

Nous avons vérifié si les surnageants de bactéries avaient un effet sur les cellules endothéliales. La technique du WST-1, qui mesure l'activité mitochondriale des cellules, nous a permis d'étudier la prolifération des cellules HUVECs. Les surnageants ne semblent pas avoir d'effet inhibiteur sur la prolifération de ces cellules (Figures 4-5; n = 2). Nous avons par la suite évalué le potentiel migratoire des cellules en présence de surnageants de bactéries et les résultats se sont avérés positifs. Nous avons vérifié si les surnageants inhibent la stimulation de la migration des HUVECs sur gélatine induite par le VEGF, le mitogène le plus souvent associé au

phénomène d'angiogenèse. Les surnageants inhibent complètement la migration par le VEGF mais également le niveau de migration basale, à environ 50% (Figure 6). L'effet inhibiteur des surnageants ne semblent donc pas spécifique au VEGF. Les essais de formation de tubes sur Matrigel (une matrice riche en laminine, reconstituant la membrane basale et qui permet la différenciation des cellules endothéliales en des structures similaires aux capillaires des vaisseaux sanguins) démontrent que les surnageants de bactéries inhibent de façon significative la formation des tubes par rapport au témoin chez les HUVECs (Figures 7A-7B; n = 2). L'ensemble de ces résultats indiquent que les surnageants de bactéries contiennent des molécules qui ont un potentiel antiangiogénique.

1.4 Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans ce projet semblent démontrer qu'il y a, dans les surnageants provenant de bactéries lactiques contenus dans les produits de Bio-K Plus, des molécules relarguées par les bactéries qui semblent avoir une activité antiangiogénique.

En résumé, les principales conclusions de ce projet sont les suivantes :

Un effet inhibiteur des surnageants de bactéries a été observé sur la migration des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs) et sur la formation de structures de capillaires par ces cellules;

Objectif

moléculaires dans les cellules endothéliales et Caractériser et identifier de nouvelles cibles cancéreuses modulées par le Bio-K Plus.

angiogéniques du Bio-K Plus Volet II: Propriétés anti-

Approches expérimentales proposées:

- Effet sur la formation des réseaux de capillaires sanguins;
- Effet sur la migration des cellules endothéliales

Modèles utilisés

Cellules endothéliales en culture:

- Huvccs

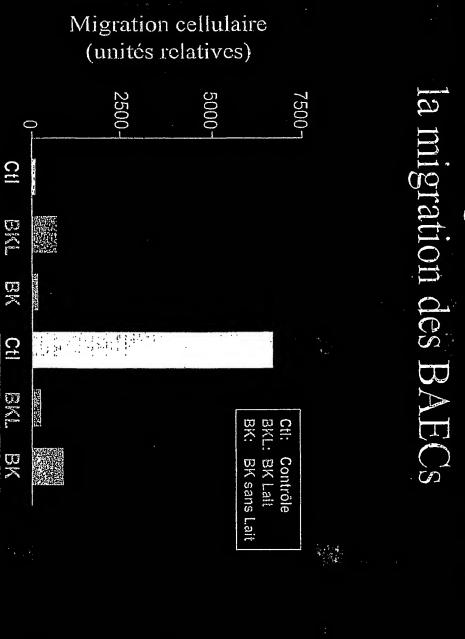
(cellules endothéliales de veine ombilicale humaine):

Baecs

(cellules endothéliales de l'aorte bovine).

Effet de différents surnageants de la formation de structures capillaires par les cellules endothéliales (Huvecs) $\mathbf{\Sigma}$ Longueur des tubes (% du Ctl) $\mathbf{\Omega}$ S S SC SF Ctt: Contrôle S: Non concentré SC: Concentré SF: Filtrat

tet des surnageants de *Bio-K Plus* sur



VEGF

Résultats II

potentiel antiangiogénique: Les surnageants de Bio-K Plus semblent démontrer un

0 la migration induite par le VEGF est inhibée;

endothéliales. l'inhibition de la migration est spécifique aux cellules

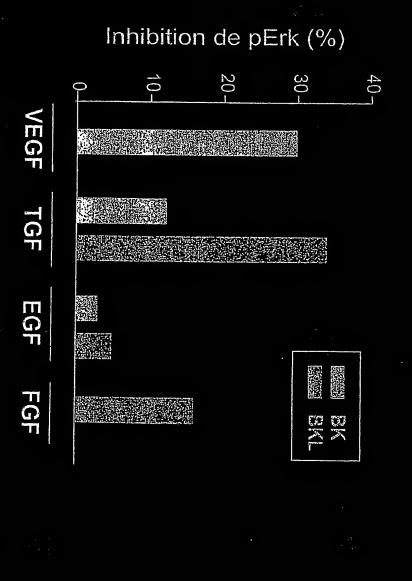
Volet III: Inhibition des récepteurs

Approches expérimentales:

1- Mesure de la phosphorylation de VEGFR;

2- Mesure de l'activation des voies de signalisation (Erk).

Plus sur différents récepteurs de facteurs de Effet antagoniste des surnageants de Bio-K croissance



RÉSUITATS III

phosphorylation du récepteur VEGFR-2 et celle de la Le *Bio-K Plus* sans produit laitier semble inhiber la protéine de signalisation Erk induite par le VEGF

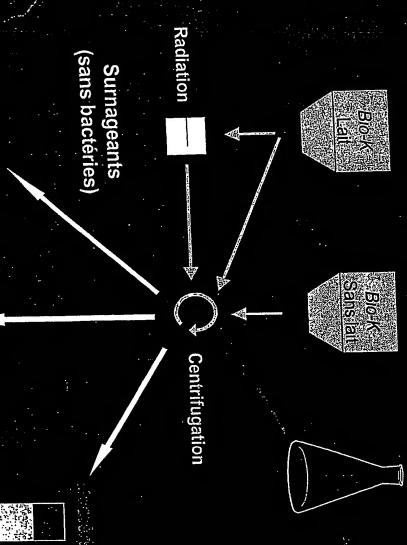
spécifiquement la phosphorylation de Erk induite par le Le Bio-K Plus avec produit laitier semble inhiber plus

Conclusion

Plus semblent sécréter des molécules actives qui ont Les bactérie lactiques composant les produits Bio-K

un potentiel d'ach vité antiangiogénique.

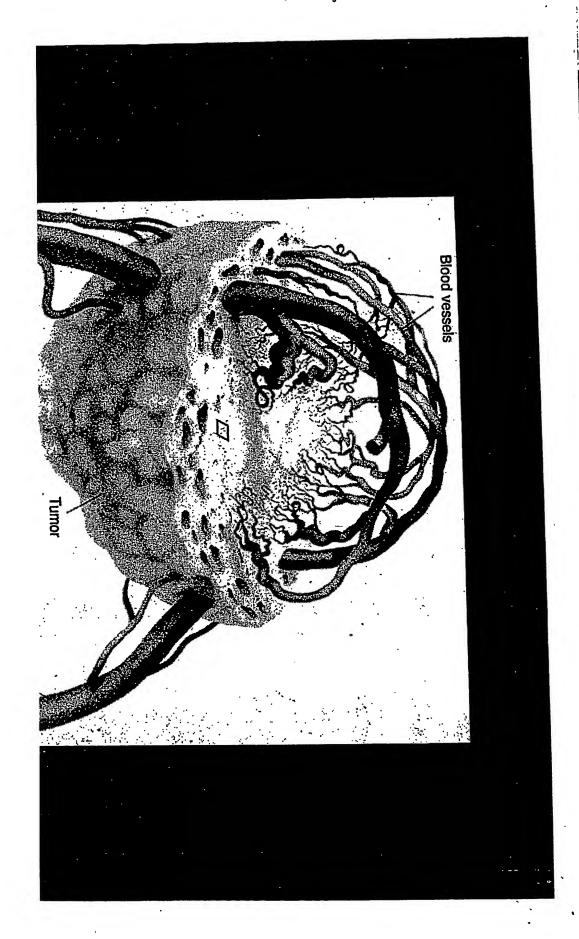
Produits Bio-K Plus



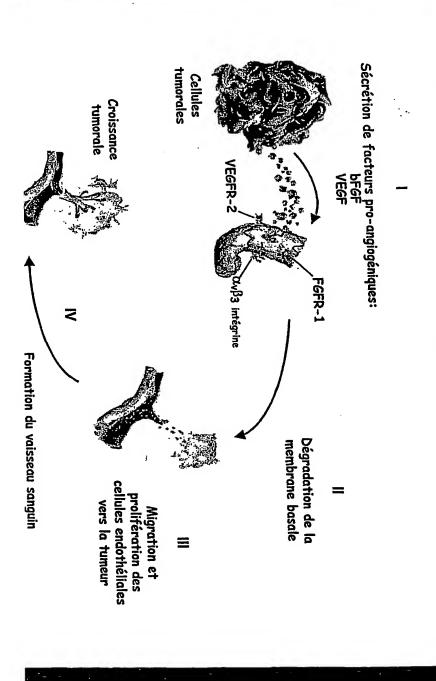
Bio-K Sans lait

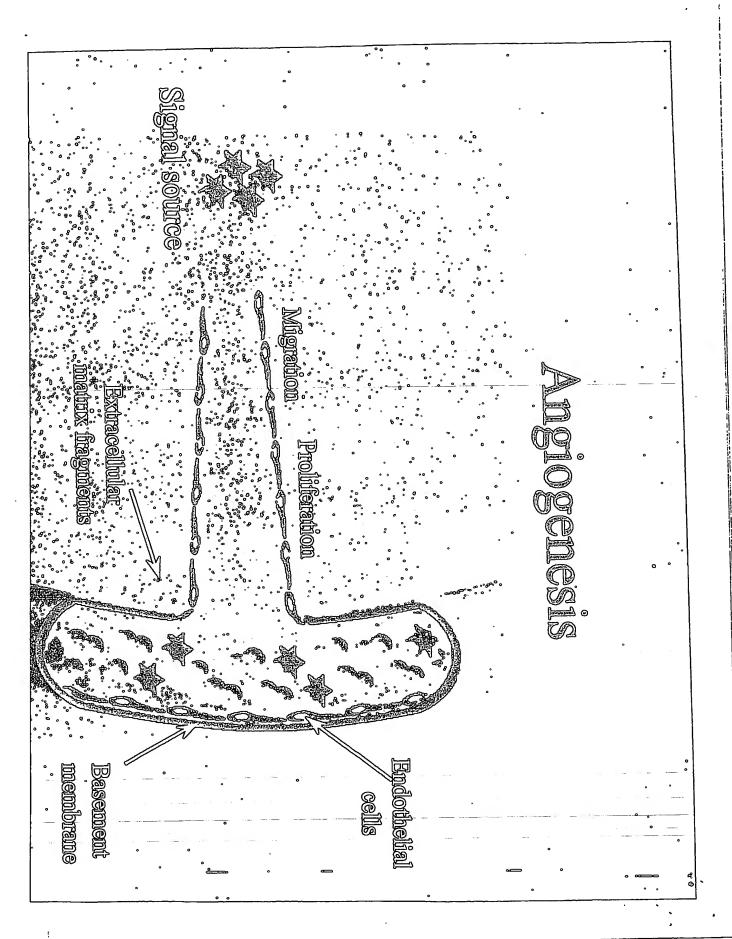
(BKL)

Concentré 10X (molécules > 5 000 kDa) (SC) Filtrat (molécules ≤ 5 000 kDa)

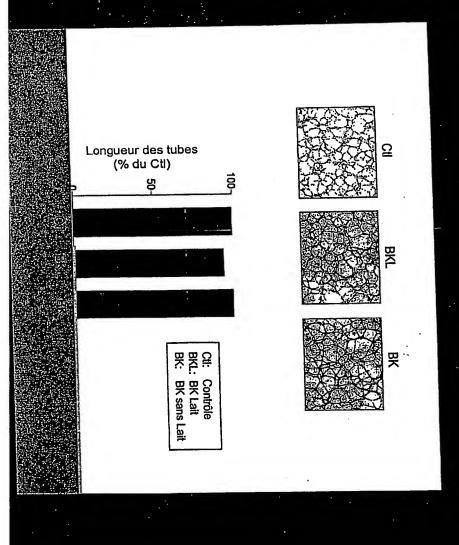


Angiogenèse tumorale



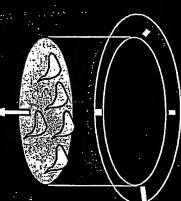


Effet de différents surnageants de Bio-K Plus sur la ormation de structures capillaires par les cellules endothéliales (Huvecs)



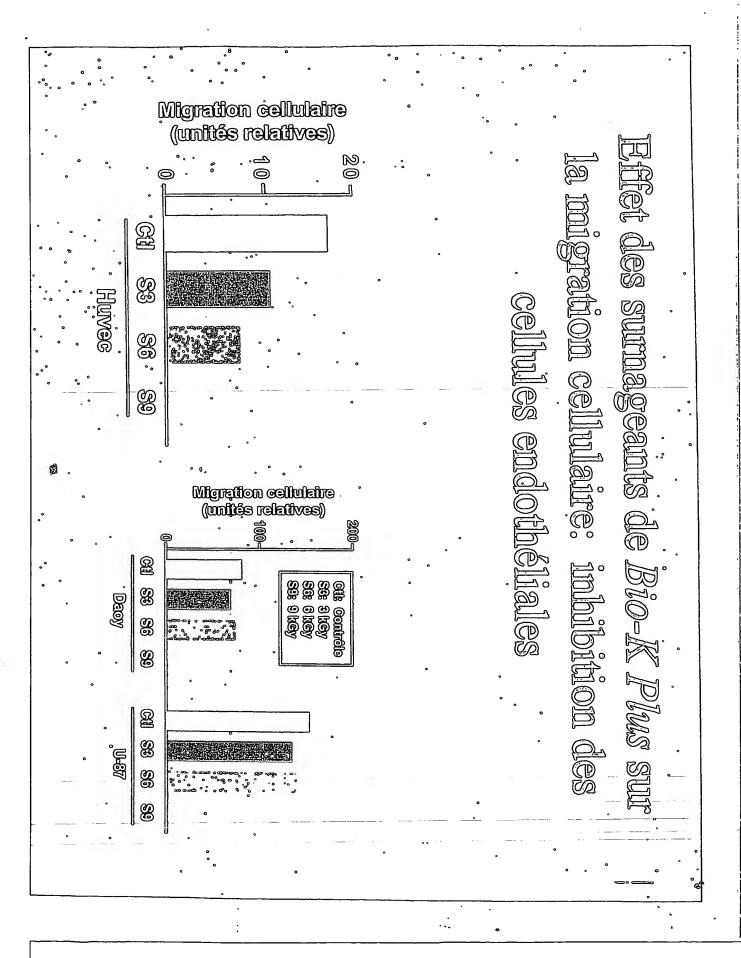
Essai de Migration

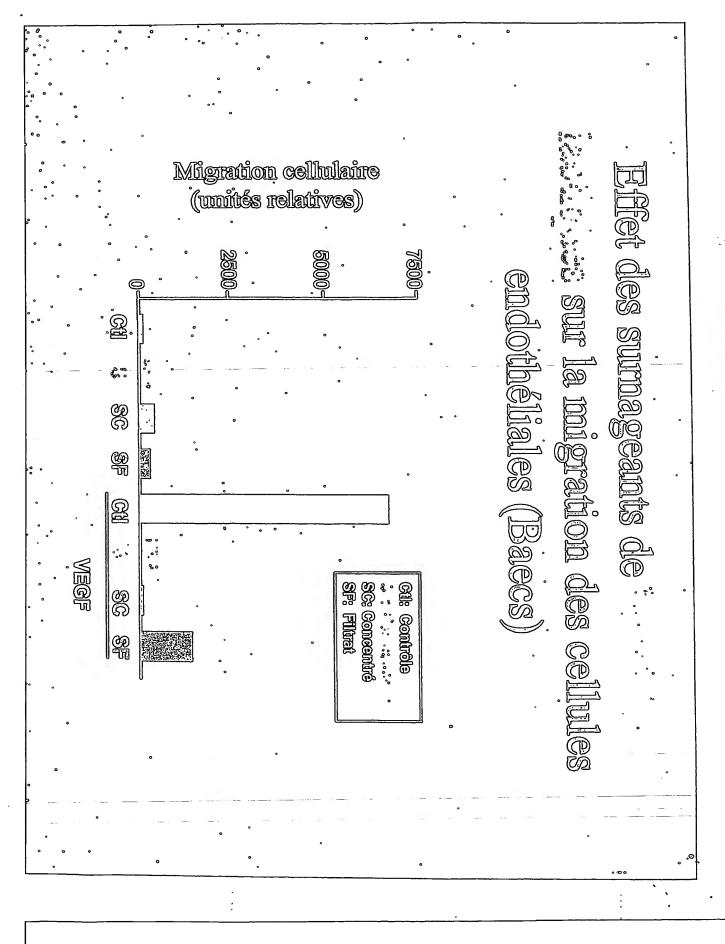
Migration



Inhibiteur





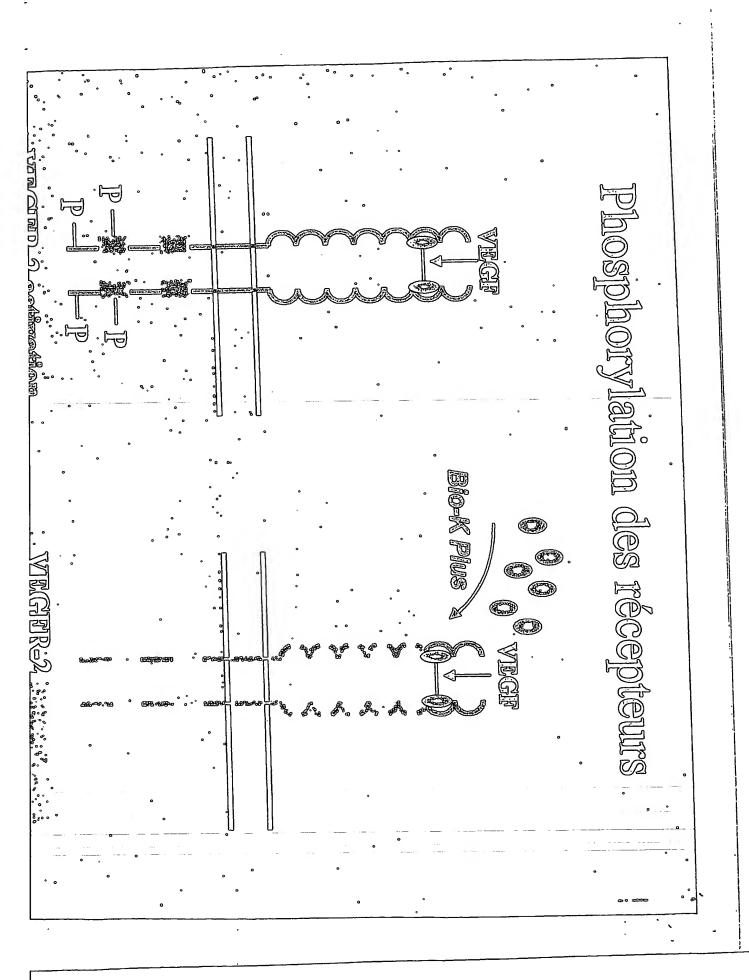


Résultats II

nageanus de bariti ngiogénique:

la formation de structure

· la migration induite par le facteur de croissa Viscif, est inhibée. . . · · ·

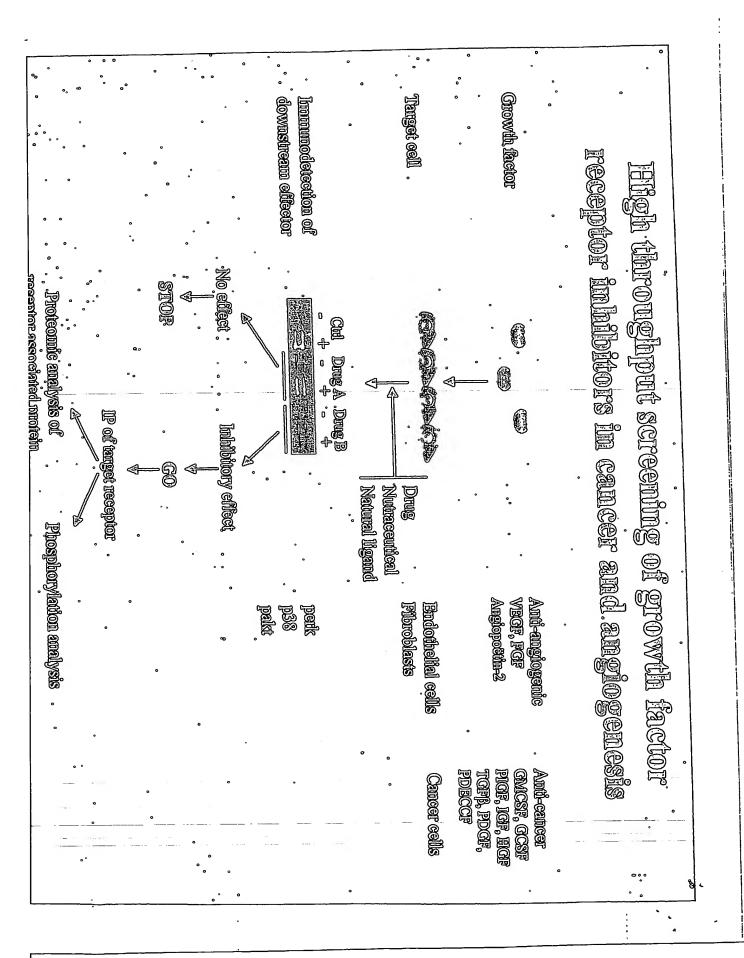


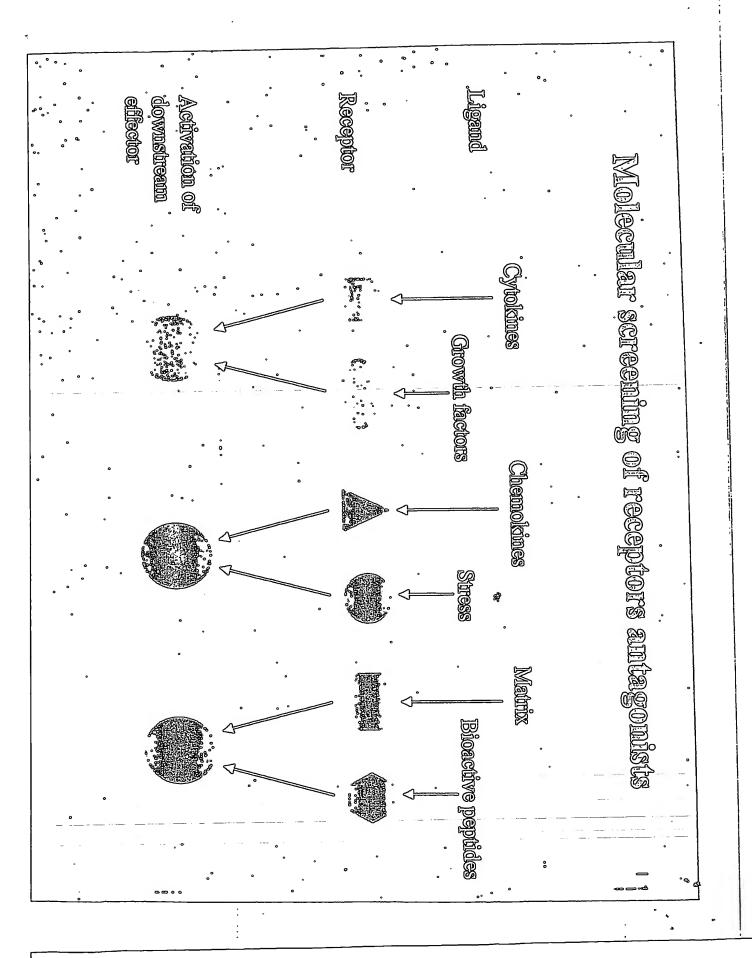
Effet des surnageants de Bio-K Plus sur la phosphorylation du VEGFR-2

VEGF

BK CH BK BK

VEGFR-2





phosphorylation de la protéine Erk par le Effet du surnageant de Bio-K Plus sur la VEGF

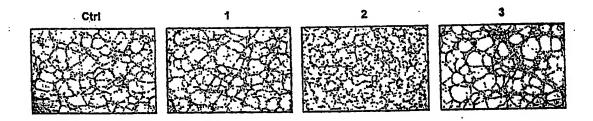
VEGF

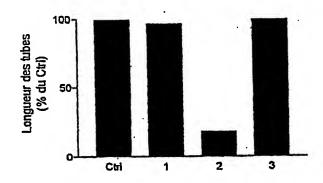
BK Ctl BK

D · Erk

Figure 1A

Effet de différents surnageants de bactéries lactiques sur la formation de structures capillaires par les cellules HUVECs



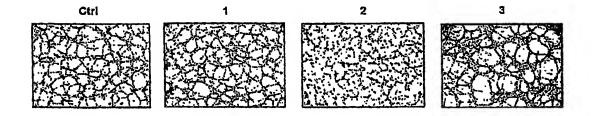


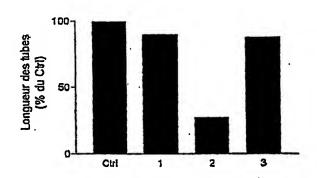
- Légende 1: Surnageant de bactéries lactiques 2: Surnageant de bactéries lactiques concentré
- (molècules > 5 000 kDa) 3: Filtrat de surnageant de bactéries lactiques (molécules ≤ 5 000 kDa)

| | X Labels | Α |
|----------|------------|----------|
| ł | Surnageant | cellules |
| <u> </u> | X | Y |
| 1 | Ctrl | 100.0 |
| 2 | 1 | 96.7 |
| 3 | 2 | 18.2 |
| 4 | 3 | 100.0 |

Figure 1B

Effet de différents surnageants de bactéries lactiques sur la formation de structures capillaires par les cellules HUVECs



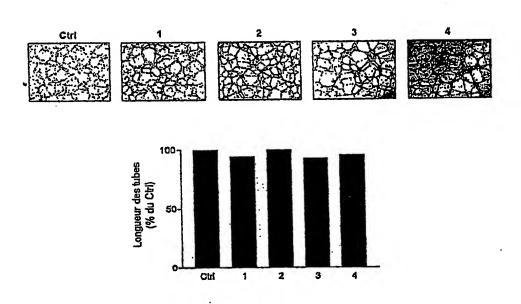


- Légande
 1: Surnageant de bactèries lactiques
 2: Surnageant de bactèries lactiques concentré
 (molècules > 5 000 kDa)
 3: Filtrat de surnageant de bactèries lactiques
 (molècules ± 5 000 kDa)

| | X Labels | Α |
|---|------------|----------|
| | Surnageant | cellules |
| | X | Y |
| 1 | Ctrl | 100.0 |
| 2 | 1 | 90.0 |
| 3 | 2 | 27.5 |
| 4 | 3 | 87.5 |

Figure 2A

Effet de différents surnageants de Bio-K Plus sur la formation de structures capillaires par les cellules HUVECs



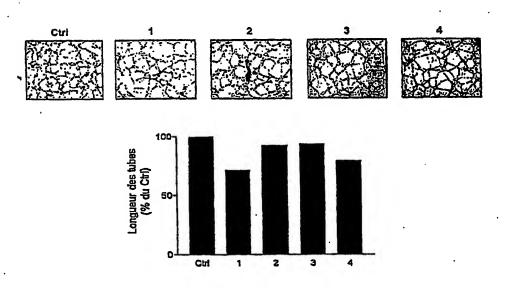
- Légonde
 1: Surnageant de Bio-K Plus (avec produit laîter)
 2: Surnageant de Bio-K Plus (asus produit laîter)
 3: Surnageant de Bio-K Plus (avec produît laîter)
 pH ajusté (7.2)
 4: Surnageant de Bio-K Plus (sans produit laîter)
 pH ajusté (7.2)

| X Labels | A |
|------------|---------------------|
| Surnageant | Longueur |
| X | Υ |
| Ctrf | 100.0 |
| 1 | 94.2 |
| 2 | 100.0 |
| 3 | 92.7 |
| 4 | 95.4 |
| | Surnageant X Ctrl 1 |

11

Figure 2B

Effet de différents surnageants de Bio-K Plus sur la formation de structures capillaires par les cellules HUVECs



- Légende

 1: Surnageant de Bio-K Plus (avac produit laiter)

 2: Surnageant de Bio-K Plus (sans produit laiter)

 3: Surnageant de Bio-K Plus (avec produit laiter)

 pH ajusté (7.2)

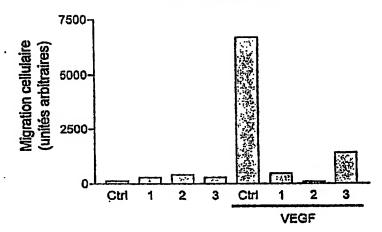
 4: Surnageant de Bio-K Plus (sans produit laiter)

 pH ajusté (7.2)

| | X Labels | A |
|---------|-----------|----------|
| 1 | Sumageant | Longueur |
| <u></u> | Х | Y |
| 1 | Ctrl | 100.0 |
| 2 | 1 | 71.2 |
| 3 | 2 | 92.2 |
| 4 | 3 | 93.7 |
| _ 5 | 4 | 79.2 |

Figure 3A

Effet du surnageant de bactéries lactiques sur la migration des cellules BAECs



Légende

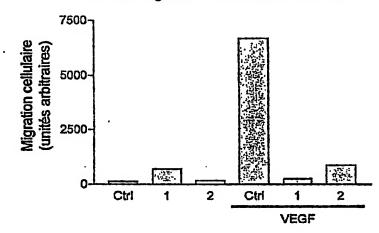
- 1: Surnageant de bactéries lactiques
 2: Surnageant de bactéries lactiques concentré (molécules > 5 000 kDa)
 3: Filtrat de surnageant de bactéries lactiques
- (molécules ≤ 5 000 kDa)

| ` | X Labels | Α |
|----|------------|----------|
| 1 | Surnageant | cellules |
| | X | Y |
| 1. | Ctrl | 119.0 |
| 2 | 1 | 291.0 |
| 3 | 2 | 409.0 |
| 4 | 3 | 291.0 |
| 5 | Ctrl | 6694.0 |
| 6 | 1 | 467.0 |
| 7 | 2 | 82.0 |
| 8 | 3 | 1407.0 |

.. •

Figure 3B

Effet du surnageant de *Bio-K Plus* sur la migration des cellules BAECs

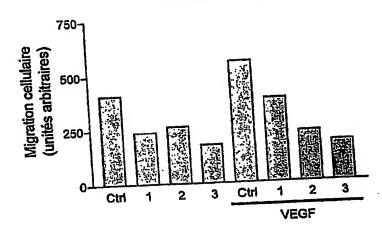


- Légende 1: Surnageant de *Bio-K Plus* (avec produit laitier) 2: Surnageant de *Bio-K Plus* (sans produit laitier)

| | X Labels | Α |
|----|------------|----------|
| ٠, | Surnageant | cellules |
| | × | Υ |
| Ī | Ctrl | 119.0 |
| ? | 1 | 697.0 |
| 3 | 2 | 174.0 |
| 1 | Ctrl | 8694.0 |
| 5 | 1 | 252.0 |
| 5 | 2 | 866.0 |

Figure 4A

Effet du surnageant de bactéries lactiques sur la migration des cellules HUVECs

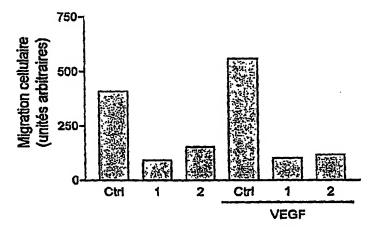


- Legende
 1: Sumageant de bactéries lactiques
 2: Surnageant de bactéries lactiques concentré
 (molécules > 5 000 kDa)
 3: Filtrat de sumageant de bactéries lactiques
 (molécules ≤ 5 000 kDa)

| | X Labels | Α |
|---|-----------|----------|
| | Sumageant | cellules |
| | X | Y |
| 1 | Ctrl | 409.0 |
| 2 | 1 | 237.0 |
| 3 | 2 | 262.0 |
| 4 | 3 | 176.0 |
| 5 | Ctrl | 559.0 |
| 6 | 1 | 386.0 |
| 7 | 2 | 231.0 |
| 8 | 3 | 184.0 |
| - | | |

Figure 4B

Effet du surnageant de *Bio-K Plus* sur la migration des cellules HUVECs

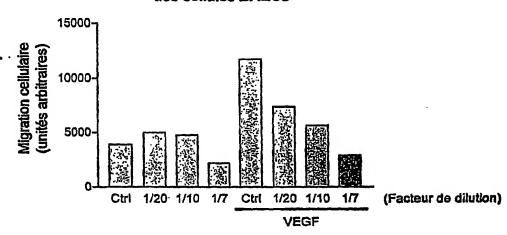


- Légende 1: Surnageant de *Bio-K Plus* (avec produit laitier) 2: Surnageant de *Bio-K Plus* (sans produit laitier)

| • | X Labels | Α |
|---|------------|----------|
| • | Surnageant | cellules |
| | X | Y |
| 1 | Ctrl | 409.0 |
| 2 | 1 | 93.0 |
| 3 | 2 | 154.0 |
| 4 | Ctrl | 559.0 |
| 5 | 1 | 102.0 |
| 6 | 2 | 118.0 |

Figure 5A

Effet du surnageant de *Bio-K Plus* (avec produit laitier) sur la migration des cellules BAECs

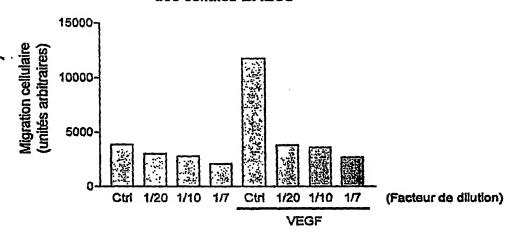


| _ | | |
|----|------------|----------|
| | X Labels | Α |
| ٠. | Surnageant | cellules |
| | X | Y |
| 1 | Ctrl | 3890.0 |
| 2 | 1/20 | 4993.0 |
| 3 | 1/10 | 4752.0 |
| 4 | 1/7 | 2183.0 |
| 5 | Ctrl | 11752.0 |
| 6 | 1/20 | 7382.0 |
| 7 | 1/10 | 5647.0 |
| 8 | 1/7 | 2868.0 |
| | | |

i ti

Figure 5B

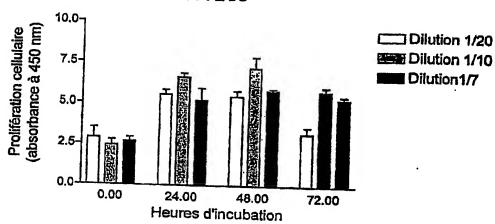
Effet du surnageant de *Bio-K Plus* (sans produit laitier) sur la migration des cellules BAECs



| • | |
|---------|----------|
| abels | Α |
| nageant | cellules |
| X | Y |
| | 3890.0 |
|) | 3037.0 |
|) | 2805.0 |
| | 2096.0 |
| 1 | 11752.0 |
| 0 | 3831.0 |
| 0 | 3618.0 |
| , | 2699.0 |
| | |

Figure 6A





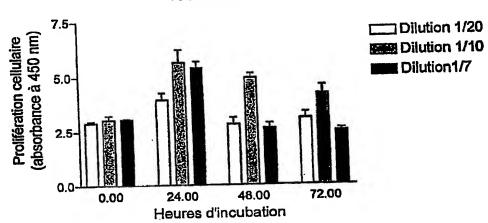
CA 02448843 2003-11-13

| - | X Values | A | | . В | | | |
|---|----------|---------------------------------|---------|---------------|----------|----------|----------|
| 1 | Heures | res Dilution 1/20 Dilution 1/10 | | Dilution 1/20 | | | |
| • | X | Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 |
| 1 | 0.00 | 4.03100 | 2.70200 | 1.86700 | 2.843000 | 1.788000 | 2.660000 |
| 2 | 24.00 | 5.59700 | 6.01100 | 4.96700 | 6.104000 | 6.892000 | 6.818000 |
| 3 | 48.00 | 4.76700 | 5.81500 | 5.75100 | 8.413000 | 6.238000 | 7.024000 |
| 4 | 72.00 | 3.98200 | 2.62900 | 3.07200 | 5.637000 | 6.281000 | 5,449000 |

| | | С | | | |
|--------------|-------------|---------|---------|--|--|
| ۱ , <u>[</u> | Dilution1/7 | | | | |
| | Y1 Y2 | | | | |
| 1 | 3.09700 | 2.22900 | 2.67500 | | |
| 2 | 4.47400 | 5.92900 | 2.06500 | | |
| 3 | 5.70900 | 5.74200 | 6.01800 | | |
| 4 | 5.43400 | 5.56600 | 4.96000 | | |

Figure 6B

Effet du surnageant de *Blo-K Plus* (sans produit laitier) sur la prolifération des cellules HUVECs



٠. `.

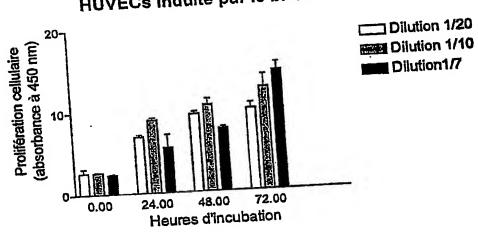
CA 02448843 2003-11-13

| | X Values | A Dilution 1/20 | | | B Dilution 1/10 | | | |
|---|----------|--------------------|---------|---------|--------------------|----------|----------|--|
| | Heures | | | | | | | |
| | X | Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 | |
| 1 | 0.00 | 2.96100 | 2.76600 | 2.97200 | 2.746000 | 3.391000 | 3.006000 | |
| 2 | 24.00 | 3.40000 | 3.94800 | 4.48500 | 4.576000 | 5.848000 | 6.529000 | |
| 3 | 48.00 | 2.56700 | 3.41400 | 2.48500 | 4.931000 | 4.661000 | 5,303000 | |
| 4 | 72.00 | 3.15800 | 3.55000 | 2.55800 | 3.782000 | 3.879000 | 4.974000 | |

| Γ | | C | | | | | |
|---|---------|-------------|---------|--|--|--|--|
| 一 | | Dilution1/7 | | | | | |
| T | Y1 | Y2 | Y3 | | | | |
| 1 | 3.04300 | 2.95800 | 3.11600 | | | | |
| T | 5.85500 | 5.48700 | 4.84600 | | | | |
| T | 3.10400 | 2.40200 | 2.37000 | | | | |
| 1 | 2.73200 | 2.38200 | 2.35500 | | | | |
| | | | | | | | |

Figure 7A

Effet du surnageant de *Bio-K*Plus (avec produit laitier) sur la prolifération des cellules HUVECs induite par le bFGF



CA 02448843 2003-11-13

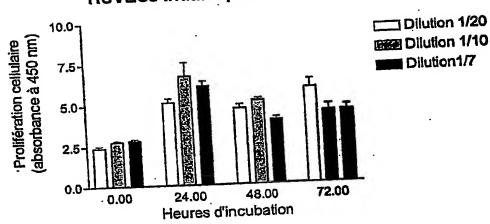
| Т | X Values | A Dilution 1/20 | | | B Dilution 1/10 | | | |
|---|----------|--------------------|----------|---------|--------------------|-----------|-----------|--|
| - | Heures | | | | | | | |
| ŀ | × | Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 | |
| + | 0.00 | 1.74400 | 2.78100 | 3.47300 | 2.638000 | 2.622000 | 2.787000 | |
| - | 24.00 | 6.51900 | 7,21900 | 7.06900 | 8.900000 | 8.645000 | 9.371000 | |
| - | 48.00 | 9,12700 | 10.10800 | 9.36600 | 12.060000 | 10.131000 | | |
| _ | 72.00 | 9.51100 | 11.41700 | 9.07900 | 14.073000 | 7.903000 | 11.007000 | |
| - | | | | | | | | |

| \exists | | С | | | | | |
|-----------|-------------|----------|----------|--|--|--|--|
| · | Dilution1/7 | | | | | | |
| | Y1 | Y2 | Y3 | | | | |
| П | 2.56700 | 2.32100 | 2.32100 | | | | |
| | 2.72800 | 5.91100 | 8.15700 | | | | |
| | 7.39000 | 7.78200 | 8.01100 | | | | |
| | 15.61000 | 12.54400 | 15.40800 | | | | |
| 5 | | | | | | | |

:4 1

Figure 7B

Effet du surnageant de *Blo-K*Plus (sans produit laitier) sur la prolifération des cellules HUVECs induite par le bFGF

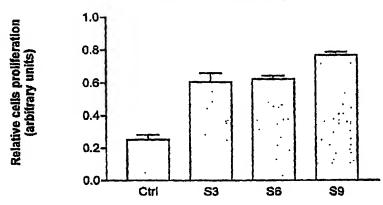


| | A Dilution 1/20 | | | В | | | С | | |
|----------|-----------------|---------|---------|---------------|----------|----------|-------------|---------|---------|
| K Values | | | | Dilution 1/10 | | | Dilution1/7 | | |
| Heures | | | Y3 | V1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 |
| X | Y1 | Y2 | | | | 2.651000 | 2,90000 | 2.66500 | 2.92700 |
| 0.00 | 2.49300 | 2.54300 | 2.19600 | 2.727000 | 2.891000 | | | 6.07000 | 6.59500 |
| 24.00 | 5.36200 | 5.32200 | 4.58300 | 6.863000 | 5.192000 | 8.081001 | 5.53800 | | |
| 48.00 | 4.19800 | 4,87500 | 4,97000 | 5.099000 | 4,939000 | 5.384000 | 3.56800 | 4.16800 | 4.03500 |
| | | | | 3,726000 | 4,554000 | 5.019000 | 5.05000 | 4.05500 | 4.22700 |
| 72.00 | 4.84200 | 6.53700 | 6.21000 | 3,720000 | 4.004000 | | | | |

Figure 4

A.

Effect of lactic bacteria supernatants on the proliferation of endothelial cells after 65 h treatment (n =1)



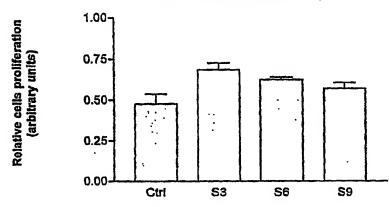
CA 02448843 2003-11-13

| abels | | Α | | | | |
|-------|--------|--------|--------|--|--|--|
| abels | Huvec | | | | | |
| X | Y1 | Y2 | Y3 | | | |
| | 0.2420 | 0.3080 | 0.2100 | | | |
| | 0.6950 | 0.6130 | 0.5110 | | | |
| | 0.6360 | 0.5810 | 0.6510 | | | |
| | 0.8000 | 0.7720 | 0.7330 | | | |

Figure 4

В,

Effect of lactic bacteria supernatants on the proliferation of endothelial cells after 65 h treatment (n = 2)

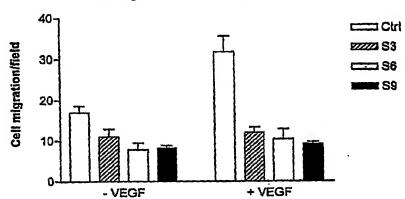


CA 02448843 2003-11-13

| X Labels | Α | | | | | | |
|----------|--------|--------|--------|--|--|--|--|
| X Labels | Huvec | | | | | | |
| X | Y1 | Y2 | Y3 | | | | |
| ;trl | 0.5800 | 0.4800 | 0.3710 | | | | |
| 3 | 0.6890 | 0.6100 | 0.7550 | | | | |
| 36 | 0.5940 | 0.6360 | 0.6430 | | | | |
| 39 | 0.5090 | 0.5730 | 0.6330 | | | | |

Figure 5





CA 02448843 2003-11-13

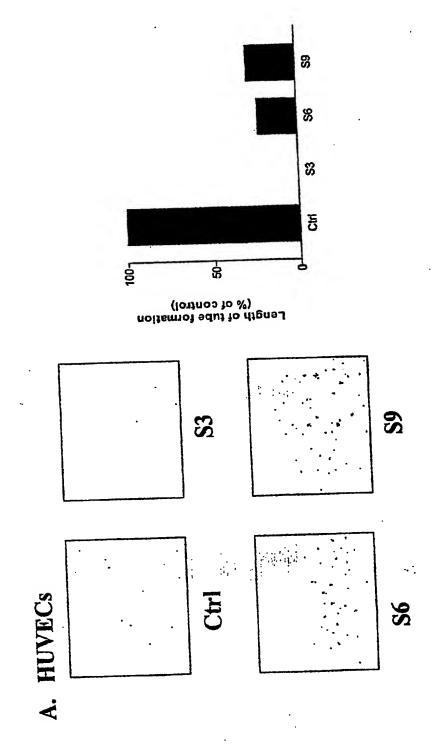
| abels | | | Α | | |
|---------|------|------|------|------|------|
| eliules | | | Ctrl | | |
| V | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| GF | 19.0 | 11.0 | 19.0 | 20.0 | 16.0 |
| EGF | 34.0 | 27.0 | 25.0 | 27.0 | 46.0 |

| | • | | | |
|------|-----|------|------|-------------|
| | | В | | |
| | | S3 | | |
| | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| _ | | 8.0 | 7.0 | 17.0 |
| 4.0 | 9.0 | | 15.0 | 13.0 |
| 13.0 | 7.0 | 12.0 | | |

| | | C | | |
|------|-----|-----|-----|------|
| | | \$6 | | |
| 74 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| 6.0 | 8.0 | 4.0 | 7.0 | 14.0 |
| 10.0 | 7.0 | 7.0 | 8.0 | 20.0 |

| - | | | D | | |
|----------|------|-----|-----|-------|-----|
| · ` · _ | | | S9 | | |
| | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| 1 | 8.0 | 9.0 | 6.0 | 10.0 | |
| 2 | 10.0 | 8.0 | 8.0 | 10.0 | 8.0 |
| | | | 0.0 | 10.01 | 10 |

Effect of the supernatants of the lactic bacteria on the tube formation by endothelial cells (n = 1) Figure 6



Effect of the supernatants of the lactic bacteria on the Figure 6

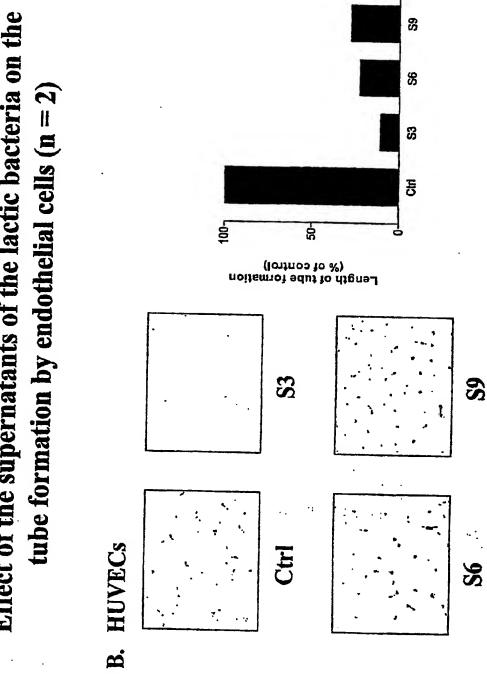
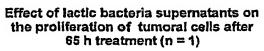
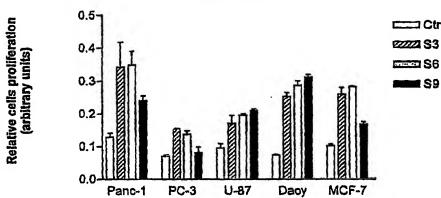


Figure 7







٠:

CA 02448843 2003-11-13

| | X Labels | | A | | | В | |
|---|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Cellules | | Ctrl | | | S3 | |
| | X | Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 |
| _ | Panc-1 | 0.1490 | 0.1300 | 0.1080 | 0.2640 | 0.4930 | 0.2710 |
| : | PC-3 | 0.0780 | 0.0720 | 0.0620 | 0.1530 | 0.1510 | 0.1570 |
| : | U-87 | 0.0700 | 0.1100 | 0.1060 | 0.1600 | 0.2170 | 0.1340 |
| ī | Daoy | 0.0780 | 0.0740 | 0.0680 | 0.2430 | 0.2410 | 0.2760 |
| ī | MCF-7 | 0.0970 | 0.0960 | 0.1110 | 0.2310 | 0.2500 | 0.2980 |

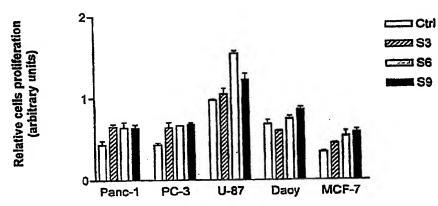
CA 02448843 2003-11-13

| | | С | | | D | |
|-----|--------|--------|--------|--------|-----------|--------|
| · [| | S6 | | | S9 | |
| | Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 |
| 1 | 0.4260 | 0.3330 | 0.2880 | 0.2380 | 0.2670 | 0.2190 |
| 2 | 0.1180 | 0.1400 | 0.1530 | 0.1130 | 0.0750 | 0.0570 |
| 3 | 0.2040 | 0.1880 | 0.1940 | 0.2120 | 0.2170 | 0.2030 |
| 4 | 0.2700 | 0.3140 | 0.2750 | 0.2960 | 0.3130 | 0.3250 |
| 5 | 0.2820 | 0.2800 | 0.2870 | 0.1790 | 0.1690 | 0.1520 |

Figure 7

В.

Effect of lactic bacteria supernatants on the proliferation of tumoral cells after 65 h treatment (n = 2)

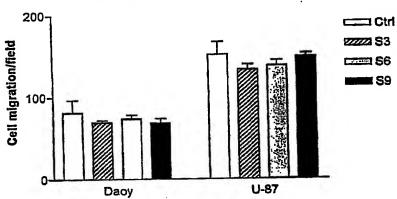


| | X Labels | Labels | | | В | | | |
|---|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| - | Cellules | | Ctrl | | \$3 | | | |
| | X | Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 | |
| 1 | Panc-1 | 0.5310 | 0.4060 | 0.3770 | 0.6060 | 0.6410 | 0.7170 | |
| 2 | PC-3 | 0.3930 | 0.4610 | 0.4530 | 0.7470 | 0.6520 | 0.5330 | |
| 3 | U-87 | 0.9860 | 0.9850 | 0.9580 | 0.9410 | 1.1730 | 1.0390 | |
| 4 | Daoy | 0.6980 | 0.7780 | 0.6770 | 0.6070 | 0.5940 | 0.6060 | |
| 5 | MCF-7 | 0.3330 | 0.3650 | 0.3280 | 0.4620 | 0.4450 | 0.4370 | |

| | С | | | D | |
|--------|----------------------------|---|--|---|--|
| S6 | | | | S9 | |
| Y1 | Y2 | Y3 | Y1 | Y2 | Y3 |
| 0.5780 | 0.7750 | 0.5740 | 0.7150 | 0.5910 | 0.6100 |
| 0.6740 | 0.6560 | 0.6680 | 0.7050 | 0.6890 | 0.6420 |
| 1.4980 | 1.6010 | 1.5430 | 1.3420 | 1.2470 | 1.0770 |
| 0.6850 | 0.7770 | 0.7860 | 0.8610 | 0.8080 | 0.9170 |
| | 0.5280 | 0.4270 | 0.5960 | 0.5190 | 0.6330 |
| | 0.5780 0.6740 1.4980 | Y1 Y2 0.5780 0.7750 0.6740 0.6560 1.4980 1.6010 0.6850 0.7770 | Y1 Y2 Y3 0.5780 0.7750 0.5740 0.6740 0.6560 0.6680 1.4980 1.6010 1.5430 0.6850 0.7770 0.7860 | Y1 Y2 Y3 Y1 0.5780 0.7750 0.5740 0.7150 0.6740 0.6560 0.6680 0.7050 1.4980 1.6010 1.5430 1.3420 0.6850 0.7770 0.7860 0.8610 | Y1 Y2 Y3 Y1 Y2 0.5780 0.7750 0.5740 0.7150 0.5910 0.6740 0.6560 0.6680 0.7050 0.6890 1.4980 1.6010 1.5430 1.3420 1.2470 0.6850 0.7770 0.7860 0.8610 0.8080 |

Figure 8

Effect of lactic bacteria supernatants on the migration of tumoral cells



| | X Labels | | | A | | |
|---|----------|-------|-------|--------|-------|-------|
| • | Cellules | | | Ctrl . | | |
| 1 | х | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| | Daoy | 33.0 | 66.0 | 85.0 | 127.0 | 95.0 |
| _ | U-87 | 137.0 | 209.0 | 151.0 | 115.0 | 148.0 |

| | | В | | |
|-------------|-------|-----------|-------|-------|
| | · | S3 | | |
| Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| 73.0 | 66.0 | 61.0 | 75.0 | 70.0 |
| 149.0 | 114.0 | 143.0 | 125.0 | 136.0 |

| $\cdot \uparrow$ | | | С | | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | S6 | | |
| - 1 | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| | 75.0 | 72.0 | 59.0 | 78.0 | 85.0 |
| | 133.0 | 160.0 | 120.0 | 145.0 | 132.0 |

| L | | | D | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------------|
| | | | S9 | | |
| | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 |
| 1 | 78.0 | 58.0 | 65.0 | 85.0 | |
| 2 | 140.0 | 151.0 | 141.0 | 164.0 | 55. 148. |

Document made available under the **Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/CA04/001968

International filing date:

15 November 2004 (15.11.2004)

Document type:

Certified copy of priority document

Document details:

Country/Office: CA

Number:

2,448,843

Filing date:

13 November 2003 (13.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 26 January 2005 (26.01.2005)

Remark:

Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in

compliance with Rule 17.1(a) or (b)



This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

| Defects in the images include but are not limited to the items checked: |
|---|
| BLACK BORDERS |
| ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES |
| ☐ FADED TEXT OR DRAWING |
| ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING |
| ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES |
| \square COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS |
| ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS |
| ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT |
| ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY |
| Потигр. |

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.